

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication :  
(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

2 696 476

(21) N° d'enregistrement national :

92 11879

(51) Int Cl<sup>s</sup> : C 12 Q 1/04

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 07.10.92.

(71) Demandeur(s) : RAMBACH Alain — FR.

(30) Priorité :

(72) Inventeur(s) : RAMBACH Alain.

(43) Date de la mise à disposition du public de la  
demande : 08.04.94 Bulletin 94/14.

(73) Titulaire(s) :

(56) Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche préliminaire : Se reporter à la fin du  
présent fascicule.

(74) Mandataire : Cabinet Regimbeau Martin Schrimpf  
Warcin Ahner.

(54) Nouveau milieu de culture pour la mise en évidence de E. coli et procédé pour son utilisation.

(57) L'invention concerne un milieu de culture destiné à la  
mise en évidence de E. coli.

Il comporte outre un milieu de culture pour E. coli, à titre  
d'agent chromogène une combinaison de:

- un composé chromogène dérivé de l'acide indolyglucu-  
ronique substrat de l'enzyme GUS et

- un dérivé d'acide alkyle, alcényle ou aryle glucuronique.

Elle concerne également un procédé de mise en évi-  
dence de E. coli.



La présente invention concerne un nouveau milieu de culture destiné notamment à la mise en évidence de Escherichia coli.

Il existe actuellement pour la mise en évidence de Escherichia coli qui est l'un des microorganismes dont la détection est la plus 5 fréquente, un certain nombre de milieux de culture.

La détection de E. coli est très importante notamment dans les industries alimentaires, au niveau du contrôle des eaux mais également en médecine, sachant que dans ce milieu E. coli peut être un agent pathogène mais également un agent mettant en évidence certains types de 10 contamination. Compte tenu de la diversité des applications et des conditions dans lesquelles doit se faire la détection, il est donc nécessaire de pouvoir disposer d'un milieu de détection qui soit simple et rapide d'emploi mais également qui soit fiable.

Or, il ressort des essais qui ont été effectués que la plupart des 15 milieux de culture utilisés actuellement, s'ils permettent de détecter un très grand nombre de souches d'Escherichia coli, ne permettent néanmoins pas de détecter d'une manière simple 100 % des contaminations. Or, on sait que généralement on ne peut pas se contenter d'une probabilité de l'ordre de 90 %, car dans la plupart des cas ce type de probabilité est tout à fait 20 insupportable pour des raisons évidentes. Les microorganismes pathogènes qui peuvent être présents dans ces échantillons non contre-sélectionnés pourront avoir tendance à se répandre parce que ne pouvant pas être mis en évidence par les méthodes traditionnelles.

C'est pourquoi la présente invention constitue un progrès 25 significatif dans la mesure où elle propose des milieux de culture permettant de mettre en évidence d'une manière simple un nombre beaucoup plus grand de contaminations de E. coli par rapport aux milieux existants.

Plus particulièrement, il s'agit d'un milieu de culture destiné à 30 la mise en évidence de E. coli caractérisé en ce qu'il comporte outre un milieu de culture pour E. coli à titre d'agent chromogène une combinaison de :

- un composé chromogène dérivé d'acide indolyl-glucuronique ou de ses sels substrats de l'enzyme GUS et

- un dérivé ou sel d'acide alkyle, alcényle ou aryle glucuronique.

Les milieux de culture pour la mise en évidence de Escherichia coli sont connus et ne seront pas redécrits en détail ci-après, mais seront 5 mentionnés uniquement dans les exemples.

En ce qui concerne les composés chromogènes, il s'agit d'agents chromogènes utilisés pour certains d'entre eux déjà dans la détection de E. coli et qui mettent en oeuvre des dérivés d'acides indolyl-glucuronique. Ces composés chromogènes sont des substrats de l'enzyme-bêta-D-glucuronidase 10 ou GUS qui par scission du substrat conduit à un dérivé coloré et/ou fluorescent par exemple.

Parmi ces dérivés de l'acide indolyl-glucuronique, il faut plus particulièrement citer les dérivés des acides halogéno-3-indolyl glucuronique et leurs sels correspondants et plus particulièrement encore les 15 composés choisis parmi l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclohexylammonium, l'acide 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique les sels de sodium et de cyclohexylammonium, l'acide 6-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, l'acide 5-bromo-3-indolyl bêta-D-glucuronique, l'acide 3-indolyl-bêta-20 D-glucuronique, leurs sels de sodium et de cyclohexylammonium.

Ces composés sont utilisés selon la présente invention en combinaison avec des dérivés de l'acide glucuronique alkylé, alcénylé et/ou arylé. Il peut s'agir de dérivés alkylés ou alcénylés en C<sub>1</sub> à C<sub>3</sub> notamment méthylés ou des dérivés arylés de type phényl ou phényl substitué ainsi que 25 les sels correspondants. Parmi les composés les plus efficaces selon la présente invention, il faut citer tout particulièrement l'acide phényl-glucuronique de même que ses sels notamment ses sels alcalins, alcalino-terreux et ses sels dérivés d'ammonium tels que par exemple les sels de type cyclohexylammonium.

30 Suivant la nature de l'agent chromogène utilisé, les colorations qui mettront en évidence la présence de E. coli pourront varier, l'un des intérêts de ce procédé est qu'il permet avec des concentrations en chromogène relativement peu élevées d'obtenir des détections des contaminations de E. coli voisines de 100 %.

Par exemple, on pourra utiliser des concentrations de composés chromogènes inférieures à 40 mg/ml et éventuellement de l'ordre de 30 mg/ml.

La présente invention concerne également un procédé de détection de souches de E. coli dans un prélèvement quelqu'il soit caractérisé en ce qu'on inocule le milieu de culture tel que décrit précédemment avec ledit prélèvement et/ou un inoculum provenant dudit prélèvement et en ce que l'on met au moins en évidence la coloration ou la fluorescence caractéristique de la présence de E. coli.

Ce milieu de culture selon l'invention présente également par rapport aux milieux de la technique antérieure l'avantage de pouvoir être mis en oeuvre selon l'une quelconque des modalités connues dans ce type de technologie. En particulier, il est possible avec les milieux selon l'invention de prévoir une inoculation dans la masse du milieu.

Cet aspect de l'invention est d'autant plus inattendu que les chromogènes dérivés de l'indolyl ne fonctionnant pas en conditions anaérobies, on aurait pu croire que le procédé d'inoculation dans la masse soit incompatible avec leur utilisation dans le milieu selon l'invention.

Enfin, on constate expérimentalement que grâce au milieu de culture selon la présente invention, l'apparition des vrais positifs est accélérée, on élimine des faux négatifs et pratiquement 100 % des contaminations de E. coli sont mises en évidence.

Les exemples ci-après sont destinés à mettre en évidence d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

25

#### Exemple 1 : Détection de souches de E. coli

Diverses souches de E. coli sont isolées sur le milieu M (en g/l : Extrait de viande 1 ; Extrait de levure 2 ; Peptone 5 ; Chlorure de sodium 5 ; Agar 15 ; Desoxycholate de sodium 1,5 : 5 Bromo-4-Chloro-3-Indolyl glucuronide 0,05).

Les boîtes sont incubées à 37°C et la coloration bleue des colonies est observée après 24 heures d'incubation.

Une des trois souches, E. coli 297-3, n'est mise en évidence qu'après addition de Phényl glucuronide.

souche <u>E. coli</u>	coloration milieu M	coloration milieu M 100mg/l Phényl glucuronide
289-3	+	+
297-3	-	+
366-1	+	+

10      Exemple 2 : Analyse d'échantillons de steaks hachés

Des échantillons de steaks sont examinés par la méthode standard de broyage dilution et étalement.

15      La gélose suivant l'invention est comparée avec un dispositif commercial sur film où les E. coli sont aussi détectés par simple coloration spécifique.

20      Les résultats indiquent que la proportion de colonies E. coli détectées suivant l'invention est plus élevée que la technique utilisant un film donnant une coloration spécifique aux colonies de E. coli.

	échantillons de steak haché	colonies <u>E. coli</u> détectées sur gélose suivant l'invention	colonies <u>E. coli</u> détectées sur film commercial pour <u>E. coli</u>
25	362	0	0
	365	0	0
	371	120	50
	368	102	50
	367	0	56
	363	2	0
	370	40	11
	379	0	0
30	380	200	29
	382	3	1
	383	9	4
	384	1	3
	386	3	2
	3006	0	0
	3007	0	0
35	3008	192	83

REVENDICATIONS

1. Milieu de culture destiné à la mise en évidence de E. coli caractérisé en ce qu'il comporte outre un milieu de culture pour E. coli à titre d'agents chromogènes une combinaison de :

- 5 - un composé chromogène dérivé de l'acide indolylglucuronique substrat de l'enzyme GUS et  
- un dérivé d'acide alkyle, alcényle ou aryle glucuronique.

2. Milieu de culture selon la revendication 1, caractérisé en ce que le dérivé d'acide glucuronique est l'acide phénylglucuronique ou ses 10 sels.

3. Milieu de culture selon la revendication 2, caractérisé en ce que le composé chromogène est choisi parmi les acides halogéno-3indolyl glucuronique et les sels correspondants.

4. Milieu de culture selon la revendication 3, caractérisé en ce que le composé chromogène est choisi parmi :  
l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclohexylammonium,  
l'acide 5-bromo-6-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclohexylammonium,  
20 l'acide 6-chloro-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclohexylammonium,  
l'acide 5-bromo-3-indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclohexylammonium,  
l'acide indolyl-bêta-D-glucuronique, les sels de sodium et de cyclo-25 hexylammonium.

5. Milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il contient moins de 40 mg/ml du composé chromogène.

6. Procédé de mise en évidence de E. coli dans un prélèvement, 30 caractérisé en ce qu'on inocule le milieu de culture selon l'une des revendications 1 à 5 avec le prélèvement ou en inoculum provenant dudit prélèvement et en ce qu'elle détecte éventuellement la présence de E. coli.

7. Procédé de mise en évidence de E. coli selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'inoculation est effectuée dans la masse du milieu 35 de culture.

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

## RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FR 9211879  
FA 477637

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	<p>LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY vol. 13, no. 4, 1 Octobre 1991, BLACKPOOL UK pages 212 - 215 I.D. OGDEN ET AL. 'An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration od Escherichia coli.' * le document en entier *</p> <p>---</p>	1, 3-7
A	<p>ZENTRALBLATT FÜR HYGIENE UND UMWELTMEDIZIN 2 vol. 189, no. 3, 1989, STUTTGART BRD pages 225 - 234 M. MANAFI ET AL. 'Ein kombiniertes Chromogen-Fluorogen-Medium zum simultanen Nachweis der Coliformengruppe unf von E. coli in Wasser.' * tableau 1 *</p> <p>-----</p>	2
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
		C12Q
1		
Date d'achèvement de la recherche 09 JUIN 1993		Examinateur VAN BOHEMEN C.G.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul  Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie  A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général  O : divulgation non-écrite  P : document intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention  E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.  D : cité dans la demande  L : cité pour d'autres raisons  &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>		

